

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2006～2010

課題番号：18101006

研究課題名（和文） 多機能ナノ電気化学顕微鏡システムの創成

研究課題名（英文） Multifunctional Nano-Scanning Electrochemical Microscopy

研究代表者

末永 智一（MATSUE TOMOKAZU）

東北大学・大学院環境科学研究科・教授

研究者番号：70173797

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学，マイクロ・ナノデバイス

キーワード：マイクロ化学システム，単一細胞計測

## 1. 研究計画の概要

マイクロ・ナノ電極をプローブとした電気化学顕微鏡システムに機能性分子修飾，近接場光計測及びイオン電流計測を付加した多機能ナノ電気化学顕微鏡を開発すると共に単一細胞レベルでの多項目定量解析手法を確立し，新規細胞診断システムへ展開させる。

## 2. 研究の進捗状況

## (1) フィードバック距離制御システム確立

細胞表面の数 nm の形状起伏，及び形状の時間変化をイメージング可能なフィードバック距離制御システムを確立した。

①スタンディングアプローチモードを採用し，細胞など起伏の激しいサンプルに対しても正確な制御が可能となった。

②アルゴリズム変更によりシアフォースフィードバック距離制御およびイオン電流に基づく距離制御を高速化した。これにより膜受容体の活性化に起因した細胞形状の時間変化の追跡を達成した。

## (2) 多機能ナノ電極による単一細胞機能の高解像度イメージング

## ①酵素修飾ナノ電極

白金線を挿入した石英管を最尖化する1段階操作により電極径数十～数百 nm の Pt ナノディスク電極を作製し，単一酵母における呼吸電子伝達鎖の酵素活性のイメージングに成功した。さらに，電極表面への機能性分子の固定化膜としてアダマンタン自己組織化単分子膜や Os 錯体で修飾した過酸化水素電極の作製に成功した。また，酸素検出型酵素センサを開発し，細胞の呼吸活性計測を行った。

②光ファイバ／ナノリング電極，及びナノピペット／ナノリング電極

細尖化光ファイバ外壁への金属のスパッタ蒸着，及び絶縁用電着塗料の被覆により，先端径 500 nm 以下の多機能プローブの作製に成功した。このプローブで，基板上的酵素パターンの数百 nm の起伏と，酵素活性分布の高解像度同時イメージングに成功した。さらに，単一細胞の形状，活性，受容体発現の 3 系同時計測に成功した。

## ③イオン選択性ナノ電極

K イオン選択性電極を作製してシアフォース距離制御システムに搭載し，直径 10  $\mu\text{m}$  程度のナフィオンスポットの形状と K イオン濃度の同時計測に成功した。

## ④mRNA 回収プローブ電極

リング電極を用いて単一細胞の電場破碎と mRNA 回収を実現した。また，2つの開口を有する微小流体プローブを作製し，1本のプローブで単一細胞への薬剤投与による細胞破碎と mRNA の回収を実現した。

## 3. 現在までの達成度

## ①当初の計画以上に進展している（理由）

フィードバックを用いたナノ電極－サンプル間距離制御システムは形状解像度，イメージング時間に関し当初の目標性能に達した。多機能ナノプローブの開発は，目標サイズ，機能を有する各種プローブ（形状，蛍光，イオン電流，酸化還元電流の検出用）の作製に成功した。酵素電極に関してはサイズのナノ化には至っていないが，ナノディスク電極やリングナノ電極の作製法など必要な要素技術は確立できた。膜受容体，及びイオンチャンネルに関する基礎検討結果を元に，多機能ナノ電極による酵素活性，膜受容体，及び単

一細胞機能の可視化を実現した。特に酵素活性の可視化では、酵素パターン表面の数百 nm の形状起伏と、形状に対応した酵素活性分布の高解像度イメージングに世界で初めて成功した。この形状・電流計測の解像度は、酵素抗体法により標識した膜タンパク質の細胞表面分布のイメージングを可能にすると期待できる。以上より、当初の目的を超える研究の進展があり予定以上の成果が見込まれる

#### 4. 今後の研究の推進方策

(1) より精密なフィードバック距離制御システム確立

シアフォース、及びイオンコンダクタンスによる距離制御の精度をサブマイクロメートルレベルに上げ、細胞や細胞に発現するタンパク質（各種機能分子、受容体、イオンチャネルなど）の分布および機能解析を行えるシステムとする。

(2) 多機能ナノ電極による単一細胞解析

ナノピペット／ナノリング電極をさらに高解像度化し、イオンチャネルなど細胞に発現するタンパクの機能と形状を高解像度に同時イメージングを行う。さらに、mRNA などの生体成分の回収や放出を行うプローブと電気化学計測用電極を組み合わせ、同時多角的な細胞機能評価を行う。

(3) 細胞が発現するタンパク質と疾病の関連を解析

イオンチャネルや受容体を含む、細胞が発現するタンパク質の発現量および機能と疾病の関連性についてさらに調査解析を進め、疾患の早期発見と治療に適用できる細胞診断システムへの展開を目指す。

#### 5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 32 件)

① Y. Takahashi, T. Miyamoto, H. Shiku, R. Asano, T. Yasukawa, I. Kumagai, T. Matsue, Electrochemical Detection of Epidermal Growth Factor Receptors on a Single Living Cell Surface by Scanning Electrochemical Microscopy., *Anal. Chem.*, in press.

② Y. Hirano, Y. Nishimiya, K. Kowata, F. Mizutani, S. Tsuda, Y. Komatsu, Construction of Time-Lapse Scanning Electrochemical Microscopy with Temperature Control and Its Application To Evaluate the Preservation Effects of Antifreeze Proteins on Living Cells, *Anal. Chem.*, 80, 9349-9354, 2008, 査読有

③ H. Yamada, Y. Ikuta Y, T. Koike T, T. Matsue, Fabrication of a shear force-based

ion-selective capillary probe for scanning electrochemical microscopy., *Chem. Lett.*, 37, 392-393, 2008, 査読有

④ H. Q. Luo, H. Shiku, A. Kumagai, Y. Takahashi, T. Yasukawa, T. Matsue, Microcontact printed diaphorase monolayer on glass characterized by atomic force microscopy and scanning electrochemical microscopy., *Electrochem. Commun.*, 2703-2708, 9, 2007, 査読有.

⑤ K. Nagamine, S. Onodera, A. Kurihara, T. Yasukawa, H. Shiku, R. Asano, I. Kumagai, T. Matsue, Electrochemical screening of recombinant protein solubility in Escherichia coli using scanning electrochemical microscopy (SECM) *Biotech. Bioeng.*, 96, 1008-1013, 2007, 査読有.

⑥ Y. Takahashi, Y. Hirano, T. Yasukawa, H. Shiku, H. Yamada, T. Matsue, Topographic, Electrochemical, and Optical Images Captured Using Standing Approach Mode Scanning Electrochemical/Optical Microscopy., *Langmuir*, 22, 10299-10306, 2006, 査読有.

〔学会発表〕 (計 25 件)

〔図書〕 (計 4 件)